



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

**La PCR Digital como herramienta para la biopsia
líquida y para la monitorización de respuesta en
neoplasias hematológicas**

Digital PCR as a tool for liquid biopsy and
monitorization of the answer in hematological
neoplasms

Autor: Sira García-Iturri Gallego

Director/es: Dra. M^a Ana Batlle López
Dra. M^a Aranzazu Bermúdez Rodríguez

Santander, Junio 2020

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	1
INTRODUCCIÓN	2
TÉCNICAS GENÉTICAS.....	2
PCR	4
PCR digital	9
ddPCR (Thermo Fisher).....	9
Droplet Digital™ PCR (PCR digital basada en gotas)	10
APLICACIONES EN BIOPSIA LÍQUIDA	11
ddPCR™ en la biopsia líquida.....	13
APLICACIONES DE LA PCR EN ENFERMEDADES HEMATOLÓGICAS	13
LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (tumores líquidos)	13
LINFOMA (tumores sólidos)	21
ACCESIBILIDAD PCR DIGITAL	23
CONCLUSIONES	23
BIBLIOGRAFÍA	24

RESUMEN

La reacción en cadena de la polimerasa digital (dPCR) es una técnica genética que supera a las anteriores en sensibilidad, linealidad, especificidad y reproducibilidad. Esto es gracias a su capacidad de cuantificación en tiempo final sin necesidad de una curva de calibración. Estas características hacen a esta técnica muy prometedora como complemento a otras técnicas en el manejo de pacientes con neoplasias hematológicas, especialmente en la monitorización de ciertas enfermedades caracterizadas por reordenamientos genómicos, así como para la detección de fragmentos de DNA presentes en baja carga difícilmente detectables por las técnicas estándar. En el caso de la Leucemia Mieloide Crónica (LMC), parece incrementar la sensibilidad para buscar pacientes con restos de enfermedad no detectable con la técnica de qRT-PCR convencional, lo que es esencial para la selección correcta de pacientes subsidiarios de discontinuación y. Por otro lado, la dPCR también podría ser un complemento interesante para la detección de fragmentos genéticos presentes en la sangre en pacientes con tumores de presentación sólida. Esto podría complementar el diagnóstico obtenido con técnicas fenotípicas y de imagen, permitiendo conocer variabilidad genómica, así como quizás monitorizar la respuesta frente a determinados tratamientos. En conclusión, la dPCR constituye una herramienta de gran utilidad, en hematología y otros campos, en monitorización de respuesta y potencialmente detección precoz de recaídas. Todo esto de forma poco invasiva al poder detectar fragmentos tumorales en muestras fácilmente accesibles como la sangre periférica.

Palabras clave: dPCR; biopsia líquida; LMC; monitorización; linfoma

ABSTRACT

The digital polymerase chain reaction (dPCR) is a genetic technique that exceeds the previous ones in sensitivity, linearity, specificity and reproducibility. This is thanks to its capacity of quantification in final time without the need of a calibration curve. These characteristics make this technique very promising as a complement to other techniques in the management of patients with hematological neoplasms, especially in the monitoring of certain diseases characterized by genomic rearrangements, as well as for the detection of DNA fragments present in low load that are difficult to detect by standard techniques. In the case of Chronic Myeloid Leukemia (CML), it seems to increase the sensitivity to look for patients with traces of disease not detectable with the conventional qRT-PCR technique, which is essential for the correct selection of subsidiary discontinuation and patients. On the other hand, dPCR could also be an interesting complement for the detection of genetic fragments present in the blood in patients with solid presentation tumors. This could complement the diagnosis obtained with phenotypic and imaging techniques, allowing knowledge of genomic variability, as well as perhaps monitoring the response to certain treatments. In conclusion, dPCR is a very useful tool, in hematology and other fields, in response monitoring and potentially early detection of relapses. All this is done in a non-invasive way by being able to detect tumor fragments in easily accessible samples such as peripheral blood.

Key words: dPCR, liquid biopsy; CML; monitoring; lymphoma

INTRODUCCIÓN

Las técnicas genéticas constituyen una herramienta esencial para la orientación diagnóstica y terapéutica de un gran número de enfermedades en la práctica clínica habitual (1), siempre como complemento a otras técnicas diagnósticas como el estudio fenotípico constituyendo parte del diagnóstico integrado que permite hacer una estratificación diagnóstica y una orientación terapéutica más personalizada. Ya desde el inicio muchas de las técnicas genéticas se utilizaban con aplicaciones genómicas, destacando su aplicación en la microbiología: Actualmente se utilizan en muchos ámbitos habiendo sido exponencial la aplicabilidad de las mismas tanto en el campo de la genética como de la genómica, destacando su utilización en las enfermedades oncológicas, neurodegenerativas, etc (2).

Las diferentes técnicas genéticas se basan en la identificación de determinadas secuencias genéticas asociadas a enfermedades concretas y su detección permite estratificar pacientes según el origen de su patología con el objetivo de darles la mejor alternativa terapéutica y monitorizar sus respuestas de la manera más eficaz posible (3). Este uso de estas técnicas entra dentro de la definición de la medicina personalizada, ya que en conjunción a otras técnicas permite un mayor conocimiento de las patologías y con ello, se puede individualizar el tratamiento de cada paciente

En el ámbito del estudio de las neoplasias hematológicas, enfermedades generalmente caracterizadas por una elevadísima morbilidad, especialmente si no se aplican los tratamientos correctos, las diferentes técnicas existentes resultan complementarias y la elección de una u otra va a depender del tipo de alteración genética que se precise analizar y del momento de la enfermedad en que se encuentre y siempre deben ir orientadas por una caracterización clínica y fenotípica previa, ya que con frecuencia no son específicas y su significado clínico varía en función del contexto clínico-fenotípico.

Algunas técnicas proporcionan una visión global del genoma, pero con una resolución muy baja, mientras que otras no proporcionan una visión global, pero si permiten una gran sensibilidad, como la PCR.

Una de las técnicas más innovadoras del campo molecular es la PCR digital. En esta revisión nos vamos a centrar la utilidad de esta técnica para la detección, diagnóstico y monitorización de las neoplasias hematológicas.

TÉCNICAS GENÉTICAS

Existen un gran número de técnicas genéticas con distintas propiedades que se han ido incorporando a lo largo de la historia a la rutina asistencial. Cada una de ella tiene diferente grado de aplicabilidad dependiendo de la entidad y el momento de la enfermedad (tabla 1).

	CITOGÉNÉTICA CONVENCIONAL (cariotipo)	FISH	aCGH/SNP arrays	PCR	NGS
SENSIBILIDAD	Baja (10%)	Media/alta*	Baja (2-30%)	Muy alta	Alta-Muy alta**
RESOLUCIÓN	Baja (5-10Mb)	Baja (>50Kb)	50-100Kb	Alta	Alta
VISIÓN GLOBAL GENOMA	Si	No (Locus específico sin limitación para conocer secuencias flanqueantes; Muy útil para reordenamientos con puntos de ruptura muy variables)	Parcial	No (genes concretos; requiere conocer secuencias flanqueantes)	Si (genes concretos vs genoma)
MATERIAL UTILIZADO	ADN	ADN	ADN	ADN o ARN	ADN o ARN
CANTIDAD DE MUESTRA	Mucha	Poca	Mucha	Muy poca	Muy poca
COSTE	+ (150€)	++	++	+	++/+++

Tabla 1: Comparación de técnicas genéticas. FISH: hibridación fluorescente in situ; aCGH: hibridación genómica comparativa; SNP: polimorfismo de nucleótido único; NGS: next-generation sequencing o secuenciación de alto rendimiento (4-9). *Habitualmente conteo de 100 a 200 núcleos; **Dependiendo del número de lecturas y cobertura por muestra

La hematología, por tanto, no ha sido una excepción, y a medida que han ido surgiendo, ha ido incorporando a su ámbito estas técnicas. Las técnicas genéticas tradicionalmente utilizadas para la caracterización y categorización, selección terapéutica y monitorización han sido la citogenética convencional (cariotipo), introducida en los años 70; la hibridación in situ fluorescente (FISH) incorporada a finales de los 90; técnicas de Southern Blot, que progresivamente fueron sustituidas por técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa convencional (PCR).

La PCR fue inventada por Kary Mullis a mediados de los años 80 pero no se incorporó a la asistencia hasta los años 90. La primera aproximación para el análisis de productos de PCR, fueron técnicas semicuantitativas con geles de agarosa. En la última década se empezó a utilizar la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) y recientemente se ha introducido la PCR digital.

Otra técnica complementaria a las previamente mencionadas, introducida en la última década, es la secuenciación paralela masiva o next-generation sequencing (NGS) que, en la actualidad, al menos en la rutina asistencial, requiere un preenriquecimiento de las secuencias a evaluar, ya sea mediante una fase de preamplificación por PCR o de enriquecimiento por método de captura.

En lo relativo a la monitorización de respuesta, la técnica más comúnmente utilizada por su gran sensibilidad es la PCR cuantitativa, pudiendo llegar, en muestras de alta calidad, a detectar hasta un 0,0001% de transcritos de un determinado gen (10). En neoplasias

con reordenamientos genómicos anormales o con determinadas mutaciones la qPCR permite establecer si un paciente está respondiendo a los tratamientos y detectar precozmente recidivas, en muchas ocasiones haciendo el estudio en muestras obtenidas secuencialmente tras la exposición a los fármacos en sangre periférica, permitiendo hacer un control estrecho poco invasivo de la evolución del paciente (11).

PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica molecular usada para el diagnóstico e investigación en muchos ámbitos, incluyendo la hematología, como ya hemos comentado. Esta técnica permite la amplificación selectiva in vitro de secuencias de ácidos nucleicos diana conociendo las secuencias flanqueantes, a partir de una cantidad de muestra pequeña (12). Hace tiempo se definió como *“una técnica que consigue encontrar una aguja en un pajar, al tiempo que produce un pajar de agujas por amplificación selectiva”*.

TÉCNICA

Para poder realizar la cuantificación de ácidos nucleicos, estos se deben amplificar utilizando una serie de elementos básicos. Toda reacción necesita de una enzima ADN polimerasa, un molde de ADN, desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs), y al menos un par de cebadores. Todos estos materiales se introducen en una solución junto con un tampón químico y se someten a una serie de ciclos térmicos para amplificar millones de copias del molde de ADN (13). El proceso de amplificación se pudo automatizar gracias a que en el año 85 Kary Mullis se pudo asociar a Perkin Elmer y conjuntamente introdujeron el DNA Thermal Cycler (termociclador) (12).

Ya se han comentado, los elementos necesarios para realizar una PCR, sin embargo, es necesario concretar un poco más sobre las características que deben tener las muestras para un resultado lo más preciso posible:

1. Molde de ADN representativo:
 - a. La muestra debe contener al menos una cadena de ADN en la que se encuentre la región que se quiere amplificar. La capacidad para detectar la secuencia de interés, y por tanto de la cantidad de material de partida, va a depender de la representación de la secuencia en la muestra, lo que en enfermedades adquiridas implica necesariamente la obtención de muestra tumoral representativa. Es decir, hay que diferenciarlo de una enfermedad germinal, porque en ese caso las aberraciones están en todas las células, pero en el tumor sólo están en el tumor adquirido. Por tanto, en función de la neoplasia las muestras se obtienen de los siguientes lugares:
 - i. En **neoplasias mieloides** suele obtenerse de médula ósea y/o sangre periférica.

- ii. En **linfomas**, debe obtenerse de las masas o adenopatías +/- la médula si esta está infiltrada.
 - b. Por otro lado, la cantidad de muestra necesaria puede variar en la fase de diagnóstico frente a la fase de post tratamiento.
2. Las impurezas que presente la muestra deben estar lo suficientemente diluidas para no inhibir la amplificación.
3. El material de partida puede ser ADN genómico, o más frecuentemente, en la búsqueda de reordenamientos génicos se utiliza cADN obtenido a partir de RNA.

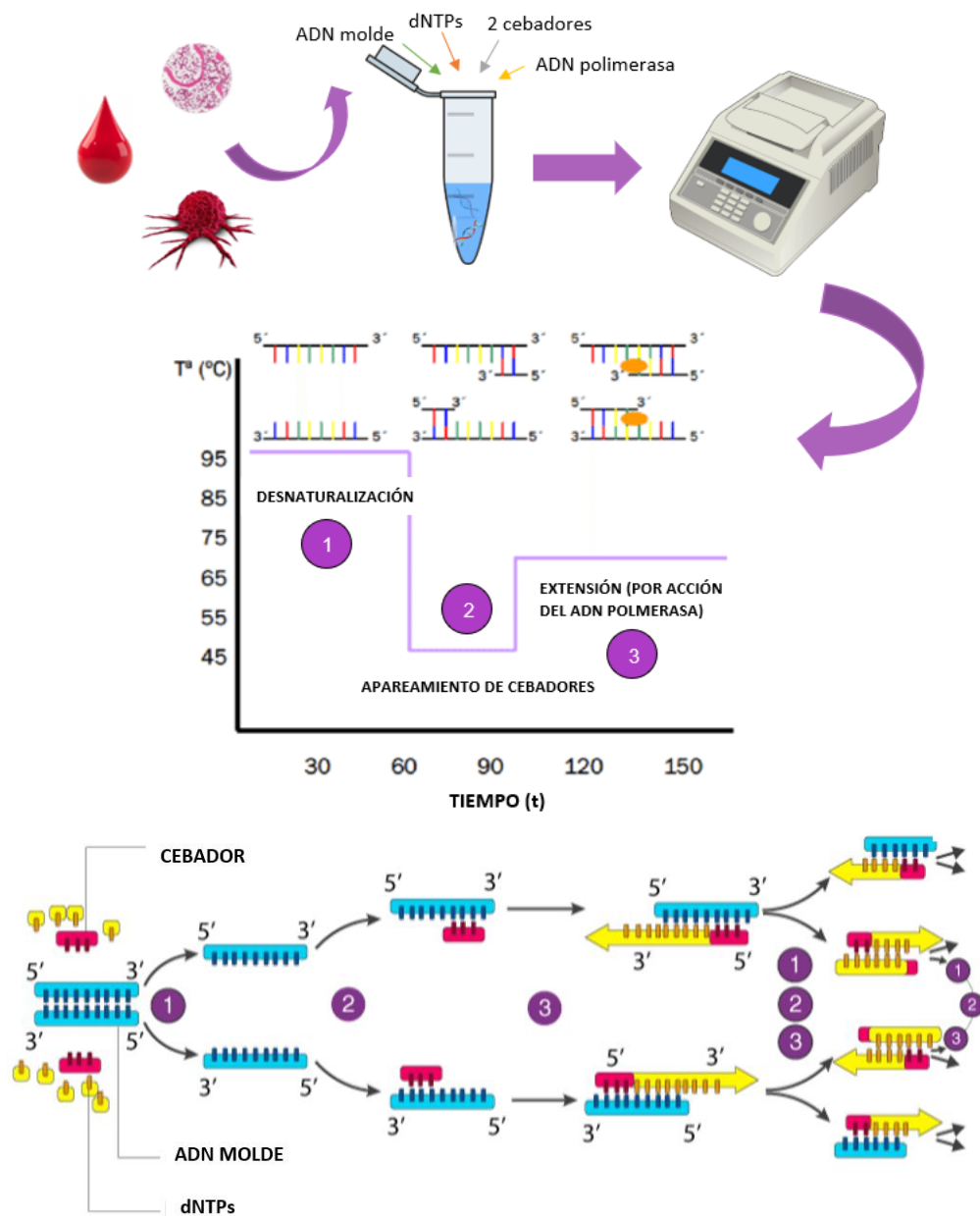


Figura 1: Representación del proceso de PCR, desde que se obtiene la muestra (médula ósea, sangre periférica, muestra tumoral...), se introduce el molde de ADN con los demás elementos necesario en un tubo eppendorf, y se procesa por un termociclador, obteniendo la amplificación buscada.

APLICACIONES:

las principales aplicaciones de la PCR y de sus numerosas variantes en el ámbito que nos ocupa son:

- Estudios de expresión genética
- Secuenciación directa de secuencias amplificadas
- Detección directa de mutaciones
- Seguimiento de la efectividad de tratamiento de diversas enfermedades
- Estudios de quimerismos (14)

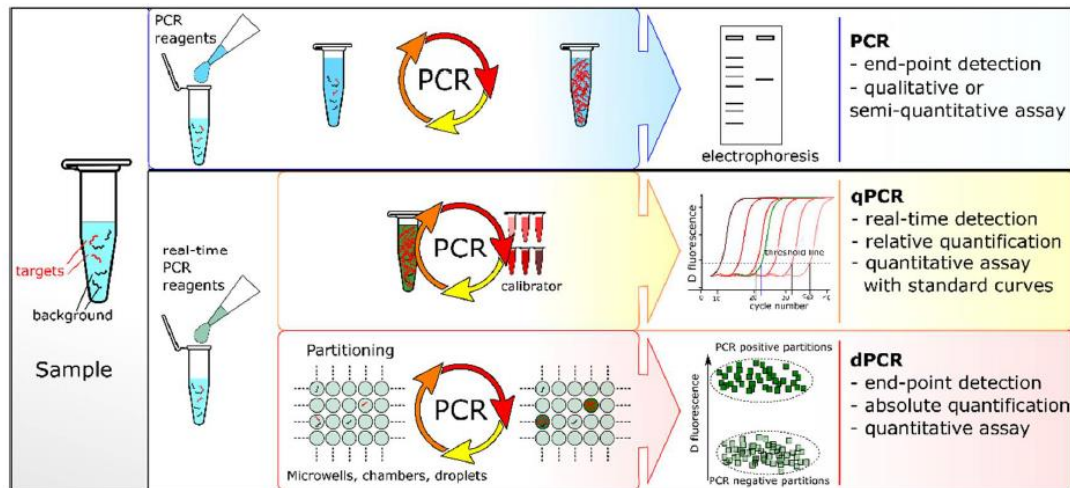


Figura 2: Comparación de técnicas basadas en PCR (15).

PRINCIPALES DIFERENCIAS DE LOS DISTINTOS TIPOS DE PCR:

Se especifican en la siguiente tabla las principales diferencias de las PCRs más habitualmente utilizadas en el laboratorio.

Tipos de PCR		PCR	PCR cuantitativa		PCR digital	
	PCR estándar	PCR nested o anidada	SYBR®-Green	TaqMan®	dPCR	ddPCR
Método de detección del producto amplificado	Tras la amplificación debe utilizarse una electroforesis estándar o capilar para su detección	Tras la amplificación de un fragmento se realiza una reamplificación de un fragmento interno utilizando otros cebadores diferentes. El método de detección es similar al previo	Utiliza un colorante de unión al ADN bicatenario, para detectar el producto de PCR conforme se va acumulando	Utiliza una sonda fluoróflora específica del gen diana para detectar el objetivo conforme se acumula durante la PCR	Explicado detalladamente más tarde	Explicado detalladamente más tarde
Reproducibilidad	Alta	Alta	Alta*	Alta	Muy alta	Muy alta
Linealidad	Variable*	Variable*	Variable*	Alta	Muy alta	Muy alta
Especificidad	Baja	Baja	Media*	Alta	Muy alta	Muy alta
Sensibilidad	Muy Baja (1%)	Baja	Media-alta*	Alta (0,0001%)	Muy alta	Muy alta
Coste	Mínimo	Bajo	Medio	Alto	Alto	Alto
Ventajas	<ul style="list-style-type: none"> - Fácil acceso al equipo - Rapidez - Posibilidad de realizar multiplex PCR a expensas de que los tamaños de los fragmentos sean diferentes. 		<ul style="list-style-type: none"> - Mayor rango dinámico de detección - Sin procesamiento posterior a la PCR - La detección es capaz de detectar hasta un cambio de 1 logaritmo - Recopila datos en la fase de crecimiento exponencial de la PCR - Un aumento de la señal fluorescente indicadora es directamente proporcional al número de amplicones generados - La sonda (TaqMan) fragmentada proporciona una amplificación de registro permanente de un amplicón 		<ul style="list-style-type: none"> - Cuantificación absoluta en tiempo final sin necesidad de una curva estándar - No es necesario depender de referencias o patrones - La precisión deseada se puede obtener mediante el aumento del número total de repeticiones de PCR - Gran tolerancia a inhibidores - Capaz de analizar mezclas complejas - Rango dinámico muy amplio 	

		- Se puede utilizar para controlar la amplificación de cualquier secuencia de ADN bicatenario	- Posibilidad de realizar multiplex PCR	
Limitaciones	<ul style="list-style-type: none"> - Precisión deficiente - Rango dinámico corto: < 2 logaritmos - Baja resolución - Discriminación basada en el tamaño exclusivamente - En PCR multiplex ambos fragmentos tienen diferente representación, la de menos representación puede dar falso negativo - Los resultados no se expresan como números (Solo permite una semicuantificación) - La visualización requiere procesamiento posterior a la PCR 	<ul style="list-style-type: none"> - Debido a que se une a cualquier ADN de doble cadena, puede generar señales positivas falsas. - No analiza en tiempo final 	<ul style="list-style-type: none"> - Necesidad de sintetizar una sonda distinta para cada secuencia diana - No analiza en tiempo final 	

Tabla 2: Comparación de las distintas técnicas de PCR utilizadas en la actualidad en el ámbito de la hematología según su método de detección. * Depende de la calidad de la plantilla y de la optimización de primers/diseño (12, 14-21)

Recientemente se está incorporando a la rutina un nuevo tipo de PCR, la PCR digital (dPCR), que como hemos visto en la tabla anterior, permite realizar una cuantificación absoluta con precisión, agregando sensibilidad y exactitud superiores a los métodos moleculares tradicionales (10).

PCR digital

La reacción en cadena de la polimerasa digital (dPCR) mide la fracción de réplicas negativas para determinar las copias absolutas, es decir, permite la cuantificación absoluta de los ácidos nucleicos elegidos, con aplicaciones de amplio alcance tanto para investigación como para diagnóstico clínico. Esto permite alcanzar el nivel de sensibilidad requerido para, por ejemplo, monitorizar de forma muy fiable pacientes con baja carga tumoral o en la biopsia líquida como complemento a otras técnicas, para detectar pequeños subclones.

Esta técnica se basa en la utilización de pocillos individualizados (una hebra de ADN en cada pocillo), la emisión de fluorescencia a tiempo final, y en el hecho de que la distribución aleatoria de moléculas en muchas particiones sigue una distribución de Poisson. Cada partición actúa como un microrreactor de PCR individual y las particiones que tienen secuencias diana amplificadas se detectan por fluorescencia. La proporción de particiones positivas es suficiente para determinar la concentración de la secuencia objetivo sin necesidad de establecer una curva de calibración (13, 15). En la tabla anterior se exponen las características y ventajas de la PCR digital. Se exponen a continuación dos modelos de PCR digital, que si bien no son los primeros introducidos en el mercado ni los únicos son los que en la actualidad se están proponiendo para la sustitución de la qRT-PCR en determinados aplicaciones de diagnóstico de neoplasias hematológicas:

dPCR (Thermo Fisher)

La PCR digital funciona dividiendo la muestra de ADN en hebras individuales que colocará en pocillos. Cada pocillo se carga con la muestra de ADN, y habitualmente con reactivos incluyendo sondas marcadas con fluorescencia (frecuentemente sondas "TaqMan") específicas para la secuencia diana. Así se crean muchas reacciones paralelas de PCR. Algunas de estas reacciones contienen la molécula objetivo (positiva), mientras que otras no (negativa). Una sola molécula puede ser amplificada un millón de veces o más. Gracias a ese colorante-marcador específico cuando el pocillo tiene la secuencia objetivo esta produce fluorescencia, pero cuando no hay secuencia objetivo, no se acumula ninguna señal. Estas señales son después analizadas en punto final. Tras el análisis de PCR, la fracción de reacciones negativas se utiliza para generar una cuantificación absoluta del número de moléculas objetivo en la muestra, sin necesidad de estándares o controles endógenos. Esta distribución en pocillos no es exacta y para tener en cuenta los pocillos que potencialmente hayan recibido más de una molécula de la secuencia diana, se aplica un factor de corrección utilizando el modelo de Poisson. El uso de un chip nanofluídico permite tener, por tanto, un mecanismo sencillo para ejecutar miles de reacciones de PCR en paralelo (20).

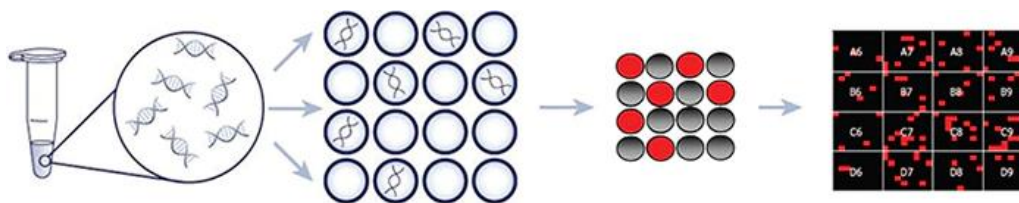
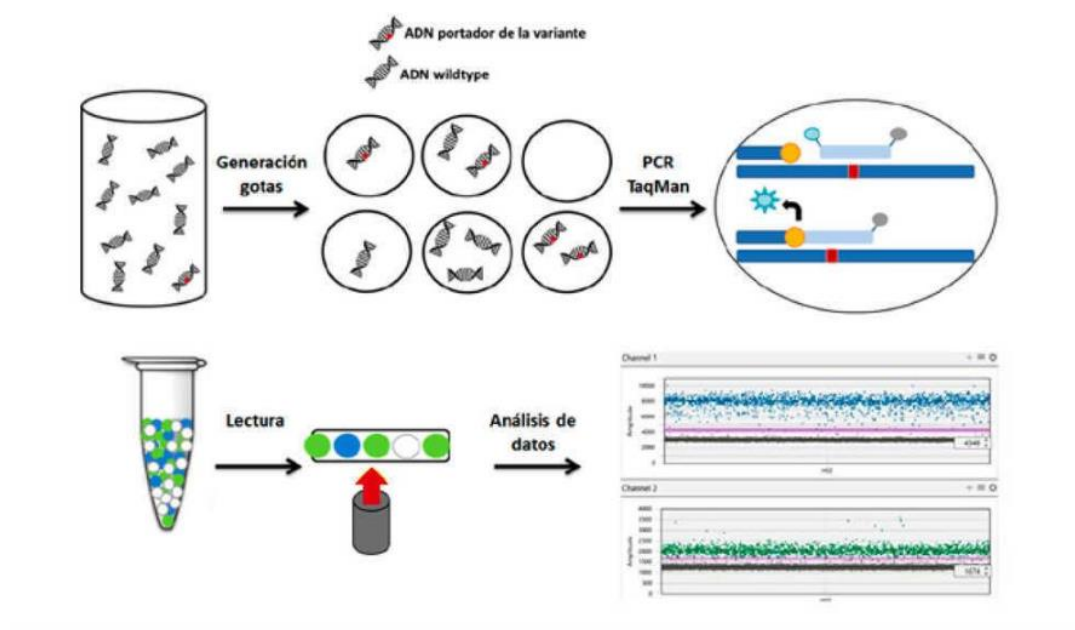


Figura 3: preparación de muestra; distribución en pocillos; cuantificación absoluta (20).

Droplet Digital™ PCR (PCR digital basada en gotas)

La PCR digital basada en gotas permite la cuantificación absoluta, contando moléculas de ácidos nucleicos encapsuladas en particiones de gotas discretas de agua en aceite, y definidas volumétricamente. Los sistemas disponibles actuales automatizados superan la falta previa de tecnologías escalables y prácticas para la implementación de PCR digital que obligaban a un proceso manual y menos preciso (22). Este sistema divide las muestras de ácido nucleico en miles de gotas del tamaño de un nanolitro, y la amplificación de la PCR se lleva a cabo dentro de cada gota. Estas gotas son equivalentes a los pocillos de la técnica anterior, es decir, cada gota contiene los mismos reactivos incluyendo las sondas específicas habitualmente TaqMan (aunque al igual que en el caso anterior en determinadas aplicaciones es posible utilizar marcadores de tipo “SYBR-Green”). Tras la amplificación por PCR, estas gotas siguen el mismo análisis que en las otras técnicas de dPCR incluyendo las estadísticas de Poisson, para determinar la concentración de la plantilla de ADN objetivo en la muestra original. Esta técnica permite la utilización de menos muestra debido a su división más precisa (21).



Revista Médica Clínica Las Condes. 2017;28:538–45

Figura 4: representación de la metodología de la PCR digital basada en gotas (ddPCR). Primero se generan las gotas con todos los reactivos necesarios, después cada una de ellas emite una señal o no, por último, estos datos se leen y analizan (29).

APLICACIONES EN BIOPSIA LÍQUIDA

La biopsia líquida es una prueba no invasiva que detecta fragmentos de ADN o células en sangre u, ocasionalmente, otros fluidos corporales (22). Se considera uno de los sistemas de diagnóstico no invasivos más avanzados con el que obtener información molecular clave relevante para las decisiones clínicas y la práctica de la medicina de precisión (23).

La detección a partir de células es un método ampliamente utilizado en hematología desde hace décadas. Esto es posible dado que las células tumorales en muchas de las neoplasias hematológicas, especialmente de estirpe mieloide, se encuentran expresadas en sangre periférica. Sin embargo, existen excepciones con enfermedades tipo linfoma que no necesariamente tienen células neoplásicas en sangre o médula y, por tanto, no son directa y fácilmente monitorizables mediante extracción venosa o con aspirados de medula ósea. Es en estos casos al igual que ocurre en los tumores sólidos la posibilidad de detección de ADN libre de células cobra mayor interés como complemento diagnóstico.

El ADN libre de células (cfADN) se refiere a segmentos de ADN que se derivan principalmente de células apoptóticas y necróticas. La presencia de cfADN circulante se informó por primera vez hace 70 años y, en individuos sanos, las células hematopoyéticas representan la principal fuente de cfADN (24). El cfADN que circula en la sangre se puede usar para evaluar una variedad de enfermedades, incluyendo cáncer, diabetes e incluso infarto de miocardio, así como para controlar los órganos trasplantados en sus receptores.

En el caso del cáncer, el cfADN a menudo se conoce como ADN tumoral circulante o ctADN. Consiste en ADN fragmentado, entre 80 y 200 pb (pares de bases) de longitud. Al analizar ctDNA es posible obtener dos amplias clases de información sobre el estado de enfermedad de los pacientes: **genómica** (o cualitativa) y **cuantitativa**.

- La información **genómica o cualitativa** consiste en el perfil de mutaciones, amplificaciones, deleciones y translocaciones en ctADN, en loci seleccionados o en todo el genoma. Este tipo de información puede proporcionar la identificación de mutaciones relacionadas con las resistencias, lo que respalda la selección del tratamiento. La identificación de las alteraciones genéticas asociadas con las resistencias a los medicamentos o la sensibilidad a los medicamentos a través del ctADN es de crucial importancia en el tratamiento del cáncer, especialmente teniendo en cuenta que se cree que la aparición de resistencias a los medicamentos adquirida es la causa del fracaso del tratamiento en el 90% de los pacientes con enfermedad metastásica. También tiene aplicación para controlar la evolución clonal del tumor a lo largo del tiempo, y respaldar la toma de decisiones para estrategias "adaptativas o reactivas". Este enfoque implica un seguimiento continuo del paciente después de la cirugía y/o tratamiento, mediante la monitorización de nuevas mutaciones de resistencia (derivadas de la adaptación de subclones tumorales) en respuesta al tratamiento, y finalmente, ajuste del régimen terapéutico en consecuencia. La relevancia de este proceso está respaldada por la corta vida media del ctADN (aproximadamente 1,5 h), que proporciona una "captura instantánea" del estado mutacional del tumor en el momento de la detección (24).

- En determinados contextos, podría dar información **cuantitativa** lo cual permitiría dar información de la representación subclonal así como quizás monitorizar la enfermedad mínima residual (EMR). respuesta terapéutica de una forma poco cruenta. Este tipo de información deriva de la medición de la concentración de ctADN, expresada como concentración de alelo mutado (copias / volumen de plasma) o fracción de alelo mutado (MAF, proporción de alelo mutado en un locus dado). Esta capacidad cuantitativa de ctADN se ha aplicado en muchos tipos de cáncer diferentes y se ha demostrado que se correlaciona con el estadio del tumor, el volumen del tumor e, indirectamente, con el tiempo de progresión después de la quimioterapia. En el estudio prospectivo publicado por Tie et al. en 2016 se demostró que, en pacientes con cáncer colorrectal, la detección de ctADN después de la resección quirúrgica del tumor se correlaciona fuertemente con la recurrencia de la enfermedad dentro de los tres años.

En resumen, esta estrategia, permite un diagnóstico no invasivo y, al mismo tiempo, representa un método conveniente para, en conjunción con otros métodos diagnósticos, brindar información sobre las aberraciones genómicas de los tumores, abordando la heterogeneidad tumoral y la diseminación metastásica a través de múltiples muestras clínicas recolectadas longitudinalmente. Conviene, no obstante, resaltar que este enfoque no se libra de problemas relevantes como la fragmentación del ADN libre circulante (cfADN), la inestabilidad del ARN, las bajas concentraciones de analito y la presencia confusa y variable de ADN y ARN de tejidos normales y células mutadas de el compartimento hematopoyético (hematopoyesis clonal) así como los potenciales errores inducidos por la propia enzima de amplificación. A pesar de las limitaciones, constituye un complemento interesante al resto de métodos diagnósticos utilizados en la actualidad. El análisis de cfADN ha identificado con éxito las mutaciones que surgen en el ADN tumoral, mientras que el análisis del ARN libre circulante (cfARN) se ha centrado principalmente en los patrones de miARN fuertemente asociados con la transformación / progresión neoplásica (23).

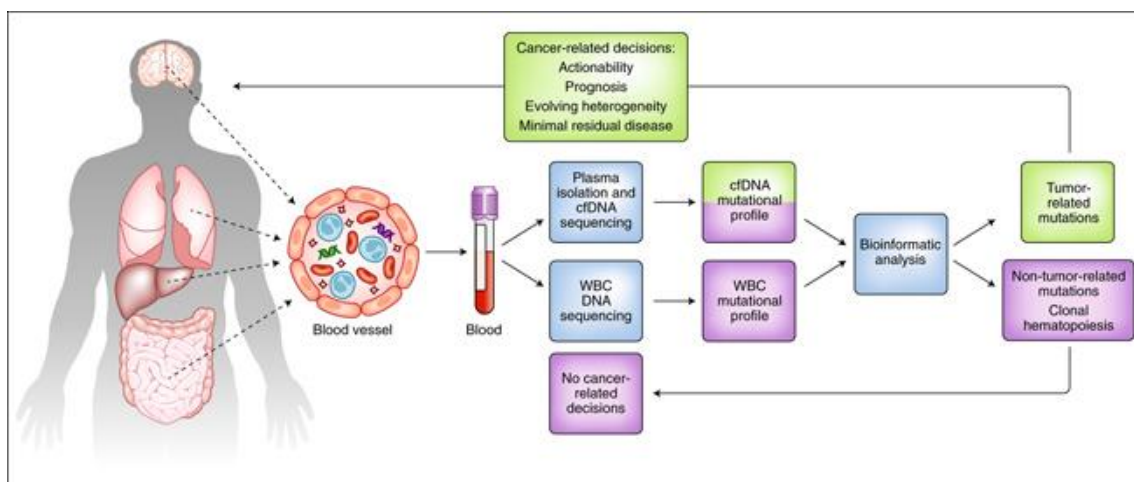


Figura 5: representación del proceso que sigue una muestra de sangre en las biopsias líquidas (25).

Los microARN extracelulares en biofluidos (plasma, suero, orina, líquido cefalorraquídeo, etc.) son biomarcadores no invasivos prometedores en múltiples enfermedades y diferentes entornos clínicos (por ejemplo, diagnóstico, diagnóstico temprano, predicción de recurrencia y pronóstico) (26, 27). Con un sistema de PCR digital es posible obtener la cuantificación absoluta de miRNA específicos, evitando varios problemas relacionados con objetivos de baja abundancia y normalización de miRNA (28-30). En sangre, el cfDNA, ctDNA y CTC de interés están presentes en niveles bajos y se encuentran en un fondo complejo de otros componentes. Además, el ADN circulante está altamente fragmentado, lo que reduce aún más la concentración de la secuencia diana intacta. La reciente “aparición” de técnicas de detección más sensibles, como ddPCR, ha permitido la detección y cuantificación de objetivos de baja abundancia en tiempos más cortos, sin requerir grandes cantidades de réplicas. Esto ha establecido a la ddPCR como una herramienta de gran aplicación en el ámbito de la biopsia líquida (22).

APLICACIONES DE LA PCR EN ENFERMEDADES HEMATOLÓGICAS

LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA (tumores líquidos)

DEFINICIÓN:

La leucemia mieloide crónica (LMC) es una neoplasia mieloproliferativa con una incidencia de 1 a 2 casos por cada 100.000 adultos, y representa alrededor del 15% de los casos de leucemia recién diagnosticados en adultos (31). Se caracteriza por expansión clonal y acumulación de células mieloides diferenciadas en la médula ósea y sangre (32). La LMC fue reconocida como una entidad clínica a principios del siglo XIX. En 1960, Nowell y Hungerford describieron un cromosoma denominado cromosoma Filadelfia (Ph) en las células de pacientes con LMC. En 1973, Janet Rowley informó que el cromosoma Ph resultó de una translocación recíproca entre los cromosomas 9 y 22. Posteriormente, en la década de 1980, se identificó la fusión de dos genes, BCR y ABL1, como causantes de esta patología, puesto que BCR-ABL1 actúan en la activación constitutiva del dominio de tirosina quinasa ABL1 que explica el fenotipo de la enfermedad (33).

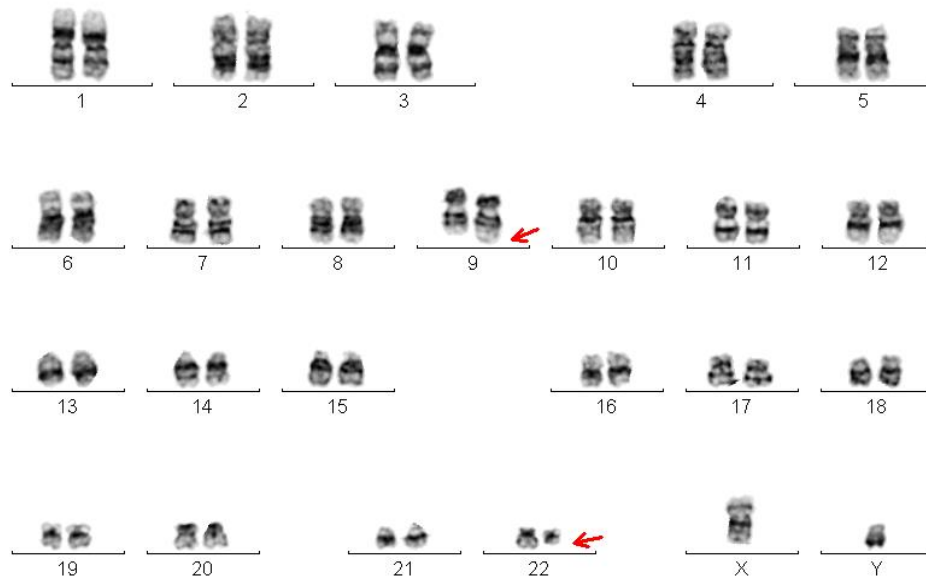


Figura 6: Metafase de paciente varón con LMC en fase de diagnóstico donde se objetiva t(9;22)(q22;q11). Imagen cedida por Laboratorio de genética Hematológica del HUMV

La LMC generalmente comienza en una fase crónica con células leucémicas en la médula ósea y luego, con el tiempo, progresa a una fase leucémica si no se aplica un tratamiento eficaz, pudiendo diferenciarse las siguientes fases (32, 33):

FASES	DESCRIPCIÓN	BLASTOS EN SANGRE Y MÉDULA OSEA
CRÓNICA	Marcada por la sobreproducción de granulocitos maduros	<10%
ACELERADA	Fase intermedia (puede no producirse y saltar a la siguiente) definida por aumento del tamaño del bazo, trombocitosis y aumento del recuento de glóbulos blancos que no responde al tratamiento	10%-20%
CRISIS BLÁSTICA	Si no se tratan las anteriores, deriva a esta fase en la que hay grandes focos de blastos en la biopsia de médula ósea, y además una gran proliferación de blastos fuera de la médula y del bazo	>20%

Tabla 3: descripción de las fases de la leucemia mieloide crónica (32-34)

VARIACIONES MOLECULARES:

La [t(9;22)(9q34.1;22q11.2)] constituye el sello molecular de la LMC y representa el intercambio de material genético entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 [t(9;22)(9q34.1;22q11.2)]. Como consecuencia de esta translocación, se une a la parte 5' del BCR (el gen cubre la región ~138.5Kbp; 23 exones) en el cromosoma 22 y la parte 3' del ABL1 (el gen cubre ~174Mbp; 11 exones) en el cromosoma 9, formando el oncogén de fusión BCR-ABL1. Esta traslocación no es, sin embargo, específica de la LMC, pudiendo detectarse en otras entidades como la neoplasia de precursores linfoides con

[t(9;22)(9q34.1;22q11.2)] o en algunos casos de Leucemia neutrofílica. Los puntos de ruptura con frecuencia son variables en las diferentes entidades.

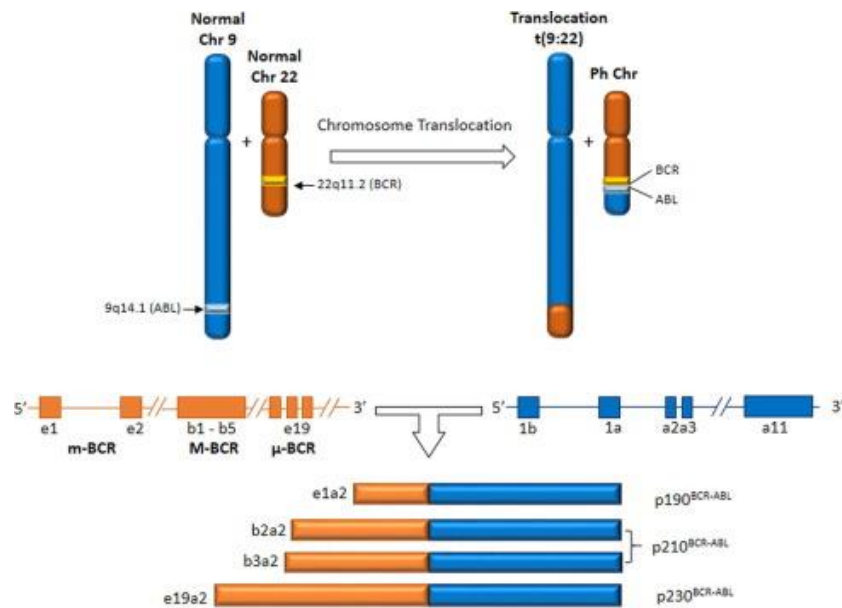


Figura 7: distintos puntos de ruptura en el cromosoma 9 y 22 (35).

Detallando los puntos de ruptura se pueden distinguir:

- El punto de ruptura en ABL1 está típicamente en la región intrónica de 150 kb entre los exones 1a y 1b. En raras ocasiones, el punto de ruptura es en la zona superior del exón 1b o en la zona inferior del exón 1a, pero casi invariablemente en la parte superior del exón 2.
- Los puntos de ruptura en BCR son más variables, pero tienden a ocurrir dentro de tres regiones principales del grupo de puntos de ruptura: la región mayor (M-BCR), la región menor (m-BCR) y la región micro (μ-BCR):
 - Los puntos de interrupción en la región M-BCR están asociados con dos transcripciones principales designadas e12-e16. Ambas transcripciones se traducen en una proteína de 210KDa. Este transcrito se detecta característicamente en LMC, aunque también existen neoplasias de precursores linfoides que presentan este transcrito (especialmente en adultos).
 - Los puntos de corte en los resultados de m-BCR suelen ser en la transcripción e1a2 que se traduce en una proteína de 190 KDa. Este transcrito se detecta característicamente en neoplasias de precursores linfoides, aunque también se detectan ocasionales subclones en pacientes con LMC o con otras entidades.
 - Las interrupciones en la región μ-BCR se transcriben en el 19a2 que codifica una proteína de 230 KDa, con mayor actividad de quinasas en comparación con otras proteínas codificadas por BCR-ABL1. Esta variante es muy infrecuente y se detecta en algunos casos de leucemias neutrofílicas crónicas.
 - También se producen otras transcripciones más raras: e6a2 (que da como resultado p195), e8a2 (que da como resultado p200) y e18a2 (que da

como resultado p225). Los puntos de interrupción en ABL1 ocasionalmente en la zona superior del exón 3, lo que resulta en una transcripción BCR-a3.

Las tirosina quinasas, activadas constitutivamente, codificadas por BCR-ABL1 activan las vías “downstream”, que afectan la adhesión celular, la reparación del ADN, la supervivencia y la proliferación, todo lo cual impulsa el desarrollo de leucemia. El producto de translocación recíproca, ABL1-BCR, está presente en el 60-70% de los pacientes con LMC (33).

DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la leucemia mieloide crónica consiste en detectar la anormalidad del cromosoma Ph por citogenética, o anomalías moleculares en el BCR-ABL1 por FISH u otras pruebas moleculares. Estas pruebas se harán en un contexto de una leucocitosis persistente inexplicada o en ocasiones trombosis. Las pruebas diagnósticas que se utilizan son las siguientes:

La aspiración de médula ósea es necesaria para confirmar el diagnóstico y proporcionar la información necesaria para la estadificación en términos de porcentajes de blastos y basófilos (38). Sobre esto se precisan aplicar diferentes técnicas genómicas:

- **CARIOTIPO:** consiste en la comprobación de la t(9;22)(q34;q11) con la presencia del cromosoma Ph (localizado en el cromosoma 22) mediante citogenética de rutina (36). Generalmente se hace un conteo de 20 metafases. Este estudio debe realizarse mediante un análisis de bandas cromosómicas (CBA) de las metafases de las células de médula ósea, mediante un tinte de bandas G (37). Esta técnica además permitirá detectar la presencia de aberraciones adicionales que sugieran evolución clonal.

- **FISH** (hibridación fluorescente in situ): consiste en la utilización de sondas genómicas específicas para los genes BCR y ABL cada uno marcado con fluoro foros diferentes, permitiendo así establecer si se ha producido intercambio de material genético entre ambos genes Se realiza con muestras de médula ósea y de sangre simultáneamente, mostrando concordancia alta (38). Generalmente se realiza un conteo de 200 núcleos interfásicos. Esta técnica no es obligatoria, pero permite un diagnóstico rápido sobre todo en casos con aspirado seco o no viable

- **RT-qPCR** (reacción en cadena de la transcriptasa-polimerasa inversa en tiempo real): a partir de cDNA se obtiene en lo pacientes afectos una amplificación de la región de unión entre BCR y ABL1. Es la técnica que se usa en la actualidad como elección para la monitorización, por su alta sensibilidad.

- **PCR digital:** desde su desarrollo, también se ha aplicado al diagnóstico molecular de la LMC siendo un método alternativo a la q-RT-PCR. Es un análisis de amplificación de punto final, con una cuantificación más precisa y con menos errores debido a que no requiere curvas de calibración, como la RT-qPCR (36, 38).

IMPLICACIÓN TERAPÉUTICA

El tratamiento de la leucemia mieloide crónica se basa en inhibir el dominio tirosina quinasa constitutivamente activo del gen BCR-ABL1 y de esta manera bloquear la hiperactivación de las rutas de señalización controladas por los genes BCR y ABL1. Sin un tratamiento eficiente, estos pacientes inevitablemente evolucionarán en un plazo de 3-5 años a una leucemia aguda. Los inhibidores de la tirosina quinasa (TKI), son en la actualidad, tratamiento estándar altamente efectivo utilizado en pacientes diagnosticados de leucemia mieloide crónica con t(9;22)(q32;q11) (39). El objetivo de tratamiento con estos inhibidores consiste en conseguir una respuesta hematológica completa tras 3 meses de tratamiento, una respuesta citogenética completa tras 6 meses y una reducción de la enfermedad molecular en al menos tres registros tras 12 meses (Tabla 4). Para conseguir la mejor respuesta posible diversos estudios han demostrado que la PCR digital puede clasificar mejor a los pacientes en "estadios moleculares" precisos debido a la mayor sensibilidad, linealidad y reproducibilidad con menores desviaciones interlaboratorio. (40).

MONITORIZACIÓN DE LA RESPUESTA

La monitorización de la respuesta de los TKIs en el tratamiento contra la leucemia mieloide crónica debe realizarse de forma estrecha mientras los pacientes lo están recibiendo, con el objetivo de comprobar la correcta evolución del mismo, cambiar de inhibidor en caso necesario y evitar recaídas. Para ello, se debe evaluar la respuesta hematológica, la respuesta citogenética y muy especialmente la respuesta molecular (Tabla 4). Después de cinco años de tratamiento de TKI en primera línea, se puede obtener una respuesta hematológica completa en alrededor del 98% de pacientes, respuesta citogenética completa en el 87%, y respuesta molecular mayor en el 80% y molecular profunda del 80%. Basándonos en las recomendaciones de la Red Europea de Leucemia (ELN):

Respuesta hematológica (HR)

Se mide mediante la evaluación de los recuentos sanguíneos completos (CBC), el diferencial de glóbulos blancos (WBC) y la evaluación del tamaño del bazo.

Respuesta citogenética (CyR)

Se detecta mediante el análisis de bandas cromosómicas de las metafases de las células de la médula ósea. El CBA debe realizarse a los 3 y 6 meses, y luego cada 6 meses hasta que se logre la respuesta citogenética completa (CCyR). Este análisis debe repetirse al menos cada 12 meses sólo si la respuesta molecular no puede ser medida (Tabla 4). El FISH de las células sanguíneas puede sustituir al CBA sólo si no se pueden obtener células de la médula ósea, y sólo para la definición de la CCyR (41).

Respuesta molecular (MR)

El principio de la respuesta molecular (RM) depende de la medición de los niveles de transcripción de BCR-ABL1 en relación con un gen de control, que suele ser el ABL. Para medir esta respuesta el Gold estándar es la RT-qPCR. Esta técnica debe realizarse,

usando células sanguíneas cada 3 meses, hasta que se logre la respuesta molecular mayor (MMR) y se confirme. Una vez confirmado se realizará la RT-qPCR cada 3 a 6 meses hasta tratar de conseguir niveles indetectables (Tabla 4). Los resultados de la respuesta molecular se deben expresar, según la Escala internacional (IS), como la proporción de transcripciones de BCR-ABL1 respecto a transcripciones de ABL1 u otras transcripciones control aceptadas internacionalmente (un ejemplo es la beta glucuronidasa, GUSB, usada tras una recaída, o en la enfermedad avanzada). Por tanto, se debe expresar y reportar en una escala de logaritmos, donde 1%, 0,1%, 0,01%, 0,0032% y 0,001% corresponden a una disminución de 2, 3, 4, 4,5 y 5 logaritmos, respectivamente, por debajo de la línea de base estandarizada que se utilizó en el estudio IRIS (37).

TIEMPO		HEMATOLÓGICA Y CITOGENÉTICA	NIVELES DE BCR-ABL1 (IS)
3 MESES	Respuesta óptima	CHR/MCyR	<10%
	Signos de alerta	-	>10%
	Fracaso	No CHR	>10% y/o nuevas mutaciones
6 MESES	Respuesta óptima	CHR/CCyR	<1%
	Signos de alerta	-	>1%
	Fracaso	-	>10% y/o nuevas mutaciones
12 MESES	Respuesta óptima	CHR/MMR	<0,1%
	Signos de alerta	-	1-10% y/o nuevas mutaciones
	Fracaso	-	>10% y/o nuevas mutaciones
TRAS 12 MESES	Respuesta óptima	CHR/CMR	INDETECTABLE
	Signos de alerta		>0,1%
	Fracaso	Pérdida CHR y CMR	Nuevas mutaciones
TIPO DE RESPUESTA		DEFINICIÓN	
Respuesta hematológica completa (CHR)		CBC normal, frotis de sangre periférica normal y bazo normal en el examen físico	
Respuesta citogenética mayor (MCyR)		0-35% de metafases de médula ósea con Ph+	
Respuesta citogenética completa (CCyR)		0% de metafases de médula ósea Ph+	
Respuesta molecular mayor (MMR) o MR³		BCR-ABL1 ≤ 0,1% (IS)	
MR^{4,0}		BCR-ABL1 ≤ 0,01% (IS) o enfermedad indetectable en >10000 transcripciones ABL1 en los cADN	
Respuesta molecular completa (CMR)		Indetectable BCR-ABL “>4,5 logaritmos”	
MR^{4,5}		BCR-ABL1 ≤ 0,0032% (IS) o enfermedad indetectable en >32000 transcripciones ABL1 en los cADN	
MR⁵		BCR-ABL1 ≤ 0,001% (IS) o enfermedad indetectable en >100000 transcripciones ABL1 en los cADN	

Tabla 4: Niveles ideales de respuesta al tratamiento con TKIs y definiciones de las posibles respuestas al tratamiento en LMC (37, 41). ACA: anomalías citogenéticas adicionales.

La monitorización de la LMC gracias a los años de experiencia y a la escala internacional, es la más precisa dentro de las neoplasias hematológicas, y sirve de ejemplo a seguir en la monitorización de otras enfermedades. Sin embargo, debido a la necesidad de la RT-

qPCR de utilizar curvas de calibración, se limita en cierta manera la reproducibilidad, linealidad y sensibilidad de cada monitorización. Dependiendo, por tanto, de la capacidad de cada laboratorio para alcanzar una sensibilidad adecuada para detectar el gen BCR-ABL1 y para detectar los números absolutos de las transcripciones del gen control y compararlo (37).

Para resolver este problema anterior de la variabilidad entre laboratorios, surge la posibilidad del uso de la dPCR para monitorizar esta enfermedad con una linealidad, sensibilidad y reproducibilidad mayor que la técnica RT-qPCR, gracias a las ventajas descritas en la tabla 2, como la no necesidad de una curva estándar de calibración para la cuantificación absoluta (que esta técnica realiza en tiempo final). Con esta técnica se pueden llegar a respuestas MR^{4,5} y MR⁵, que con la RT-qPCR no siempre es fácil alcanzar (42). Vemos un ejemplo en Franke et al. 2020, donde se compara la RT-qPCR, utilizada de rutina, con la ddPCR, en la detección de la respuesta molecular profunda (DMR: MR⁴, MR^{4,5} y MR⁵) en pacientes con leucemia mieloide crónica. Este estudio se realiza para comprobar si la cuantificación absoluta dPCR podría reducir la variabilidad inherente de la RT-qPCR. El ensayo, en el cual se utilizaron más de 300 muestras de cfADN, demostró una mayor sensibilidad de la ddPCR en la detección de la respuesta molecular mínima al llegar a detectar MR^{4,5}, en muestras en la que RT-qPCR ya no detectaba enfermedad (43).

DISCONTINUACIÓN DEL TRATAMIENTO EN LA LEUCEMIA MIELOIDE CRÓNICA

En la actualidad, el objetivo último de la monitorización de las neoplasias hematológicas es la discontinuación del tratamiento en aquellos pacientes con enfermedad no detectable y presumiblemente curados. Esta práctica se denomina TFR (remisión libre de tratamiento), y consiste en la interrupción del TKI en un paciente con LMC que ha presentado una respuesta profunda al tratamiento. Los pacientes con las respuestas moleculares más profundas son a los que se les han detectado respuesta MR⁴, MR^{4,5} o MR⁵ durante al menos dos años de monitorización. Con esta práctica se quiere conseguir la curación total de los pacientes, sin necesidad del uso de fármacos, algo que de momento está al alcance de muy pocos (41). En este caso la dPCR nos ayuda a seleccionar los pacientes más idóneos para beneficiarse de esta práctica. Aquí entra de nuevo en juego la sensibilidad, especificidad y linealidad de la técnica, puesto que en pacientes supuestamente con los mismos niveles de respuesta, cuando se utiliza la RT-qPCR para cuantificar la enfermedad y discontinuar el tratamiento, alrededor a un 50% de pacientes presenta recaídas. Sin embargo, cuando se utiliza la dPCR los pacientes que recaen disminuyen en torno a un 30%. Esto saca a relucir la mayor precisión de la dPCR para detección de baja carga tumoral. Hay gran cantidad de estudios que avalan esta información, a continuación, se van a describir dos de ellos:

- En Bernardi et al. 2019 se compara la precisión de la RT-qPCR y de la dPCR en la detección de la respuesta molecular profunda (DMR). Para esto, 142 pacientes con LMC fueron monitorizados una media de 24 meses. La PCR digital detectó transcripciones BCR-ABL1 en pacientes que la RT-qPCR no había podido detectar. El análisis dPCR de las muestras, agrupadas por las clases de MR, reveló una

diferencia significativa entre $MR^{4,0}$ y $MR^{4,5}$ ($P = 0.0104$) o $MR^{5,0}$ ($P = 0.0032$). Los pacientes de este segundo grupo ($MR^{4,5}$ y MR^5) que tenían valores según la dPCR $< 0,468$ copias de BCR-ABL1/ μ L mostraron una mayor duración de la DMR, que los pacientes $MR^{4,0}$ que tenían valores según la dPCR $> 0,468$ copias de BCR-ABL1/ μ L. Entre los 142 pacientes, 111 (78%) interrumpieron el tratamiento TKI; entre los 111 pacientes, 24 (22%) perdieron la $MR^{3,0}$ o $MR^{4,0}$. La RT-qPCR no pudo discriminar a los pacientes con mayor riesgo de pérdida de la MR después de la interrupción. La remisión sin tratamiento de los pacientes que interrumpieron el TKI con una dPCR $< 0,468$ fue significativamente mayor en comparación con los pacientes con dPCR $\geq 0,468$ (TFR a los 2 años 83% vs 52%, respectivamente). En conclusión, la dPCR dio como resultado un mejor reconocimiento de la DMR estable y de los candidatos a la interrupción del TKI (44).

- En Wan et al 2018 se compara la actual técnica RT-qPCR con la ddPCR, para la monitorización de la enfermedad mínima residual (EMR) en pacientes con leucemia mieloide crónica (LMC) BCR/ABL (P210) positiva. Se partió de 61 pacientes con LMC, tratados con TKI, 10 de esos pacientes tenían una $MR^{4,5}$, y se les realizó un seguimiento paralelo con ambas técnicas. Se obtuvo que con la RT-qPCR el gen se hizo indetectable tras tres análisis consecutivos hechos cada 3 meses, sin embargo, en la prueba ddPCR, 11 de los 61 pacientes con LMC (18,03%) dieron positivo tras esos meses y mostraron una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0,01$). Respecto a los 10 pacientes $MR^{4,5}$ todos perdieron $MR^{4,0}$, y 4 dieron positivo en la prueba ddPCR 3 meses antes que en la RT-qPCR. Se demostró por tanto la superioridad de la ddPCR en cuanto a sensibilidad, pudiendo esta técnica usarse siguiendo la escala internacional para estratificar mejor a los pacientes que se beneficiarán de la TFR (45).

PRONÓSTICO

El pronóstico de esta enfermedad viene definido por la respuesta de esta a los inhibidores de la tirosina quinasa. Como hemos visto en los apartados anteriores, la PCR digital es una técnica esencial para monitorizar de manera precisa la enfermedad. Por tanto, la respuesta molecular que presente un paciente analizado por PCR digital, nos podrá indicar más acertadamente su pronóstico, pues si la respuesta no cumple los estándares de tiempo estipulados, la enfermedad no estará siendo correctamente tratada y deberá cambiarse de inhibidor de la tirosina quinasa. En cambio, si durante un periodo de dos años se mantiene una respuesta molecular profunda podremos con un 70% de certeza discontinuar el tratamiento con la posibilidad de una remisión completa. Todo esto anteriormente descrito hace posible la estratificación de los pacientes de manera estandarizada, y su clasificación en subgrupos de pronóstico (41, 42)

Además, la PCR digital adicionalmente se podría utilizar con primers específicos para identificar las mutaciones puntuales más frecuentemente detectadas en pacientes en el dominio ABL1, mutaciones que a menudo son responsables de la resistencia a determinados TKIs. La detección de la mutación se ve limitada en pacientes con baja carga alélica con técnicas de PCR estándar o de NGS. Dada la mayor sensibilidad de esta

técnica, se pueden directamente descartar las mutaciones más frecuentes y/o usar el producto obtenido para su posterior secuenciación.

LINFOMA (tumores sólidos)

DEFINICIÓN

Los linfomas representan un grupo heterogéneo de neoplasias linfoides con patrones variados respecto a su comportamiento, tanto en la clínica que producen, como en el tratamiento que debe usarse (46). A pesar de las diferencias entre unos tipos y otros todos son enfermedades en las que se malignizan diversos subtipos de células linfoides. Los distintos tipos de linfocitos afectados pueden encontrarse en las diferentes estructuras y tejidos linfáticos del cuerpo (47). Históricamente se han ido sucediendo diferentes clasificaciones de los linfomas (48). En la actualidad gracias a los avances científicos la clasificación más extendida, la de la OMS, integra la información obtenida con diferentes herramientas de estudio fenotípico, clínico y molecular. Según la última clasificación los linfomas se clasifican por su célula de origen, pero además se identifican subtipos fenotípicos con aberraciones moleculares características o que implican un comportamiento clínico biológico característico (47-50).

DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Las técnicas genómicas, siempre orientadas por el diagnóstico anatomopatológico constituyen un complemento importante al proporcionar información diagnóstica, pronóstica y presentar potenciales dianas terapéuticas. En la actualidad la técnica más ampliamente extendida para la caracterización genómica de las neoplasias linfoides es la FISH por su fácil aplicabilidad y facilidad para detectar puntos de ruptura variables. La imposibilidad de monitorizar la reducción tumoral hasta ahora hacía que el papel de la PCR fuera controvertido. Sin embargo, la mejora en las técnicas de PCR junto con el descubrimiento de la liberación por parte de las células tumorales linfoides al torrente sanguíneo de fragmentos de ADN abre la posibilidad de facilitar el diagnóstico en casos no fácilmente biopsiables o permite evaluar la posibilidad de monitorizar la enfermedad (51), detectar resistencias a fármacos (52, 53), o establecer alternativas terapéuticas en pacientes refractarios, proporcionando un complemento de interés en el proceso diagnóstico y pronóstico (46). A continuación, se describen varios estudios que han tenido resultados que avalan la utilidad en este contexto:

- En Hiemcke-Jiwa et al. 2018 se estudia una alternativa para diagnosticar linfomas en el sistema nervioso central, puesto que el Gold standard es el estudio de la biopsia cerebral estereotáctica. Dado que las células tumorales son detectables en el líquido cefalorraquídeo (LCR) se utiliza esto como alternativa para la detección de MYD88 (mutación presente con elevada frecuencia en los linfomas del sistema nervioso central, beneficiándose de determinadas dianas

terapéuticas especialmente en casos refractarios), a través de la ddPCR. En este ensayo se analizaron 32 muestras de 18 pacientes con la mutación negativa y 9 con la mutación positiva. Los resultados de la ddPCR coincidieron con el diagnóstico previo. Todo esto mostró la alta fiabilidad del uso de la biopsia líquida de LCR por ddPCR para el diagnóstico de los linfomas del sistema nervioso central. Abriendo las puertas, además, de la facilidad de diagnóstico, cuando la cantidad de ADN disponible es limitada (52).

- En Cavalli et al. 2017 se compara el uso de la PCR digital y la RT-qPCR en la monitorización y diagnóstico de pacientes con linfoma folicular (LF). Se realizó el estudio tanto con sangre periférica (biopsia líquida), como con biopsia de médula ósea paralelamente. El ddPCR detectó en sangre periférica reordenamientos del gen BCL2, frecuentemente presentes en esta neoplasia, a niveles que la RT-qPCR no fue capaz de detectar. Además, también se demostró la concordancia de los resultados obtenidos mediante la biopsia líquida, con los resultados que se obtuvieron con la biopsia sólida. Esto implica la posibilidad de utilizar la biopsia líquida por ddPCR como herramienta prometedora para el diagnóstico de los linfomas de forma muy precisa y abre la posibilidad de evaluar la EMR para monitorizar la enfermedad (53).
- En Alcaide et al. 2016 desarrollaron un ensayo de ddPCR para la detección de mutaciones recurrentes de los linfomas no Hodgkin (NHL) comunes de células B, incluyendo el linfoma difuso de células B grandes, el linfoma folicular y el linfoma linfoplasmocitario. Con este ensayo querían demostrar la posibilidad de utilizar esta técnica para el diagnóstico de este linfoma en biopsias sólidas y en biopsias líquidas. Los resultados fueron satisfactorios pues en ambas muestras se detectaron las mismas mutaciones necesarias para diagnosticar estos linfomas. En conclusión, la ddPCR ofrece suficiente sensibilidad analítica y especificidad para la detección invasiva o no invasiva de múltiples mutaciones somáticas recurrentes en los NHLs de células B tanto en biopsias líquidas como sólidas (54).
- Camus et al. 2016 revisaron la utilidad del cfADN en la sangre, para la detección de variantes somáticas del linfoma difuso de células B grandes (malignidad agresiva y heterogénea que alberga frecuentes mutaciones heterogéneas), y así poder dar el tratamiento más adecuado. Se demostró que la dPCR eran suficientemente sensible para detectar mutaciones raras como XPO1, EZH2 y MYD88 en las cfADN del plasma, con una sensibilidad del 0,05%, que ya presentan dianas moleculares específicas, abriendo la posibilidad de búsqueda de alternativas terapéuticas en pacientes refractarios con posibilidad de monitorización de respuesta de forma no invasiva (55).

En la actualidad se está estudiando la aplicabilidad de la NGS y la PCR digital para la biopsia líquida. La PCR digital ofrece ciertas ventajas respecto a la NGS, pues gracias a su gran sensibilidad permite la cuantificación y monitorización de la respuesta o la evolución y, además, es menos demandante de material de alta calidad (la NGS no es siempre eficiente para su aplicación en parafina), pero se precisan más estudios para determinar la aplicabilidad de estas técnicas en la rutina asistencial.

ACCESIBILIDAD PCR DIGITAL

De lo mencionado anteriormente se puede concluir que pese a que la qRT-PCR continúa siendo una técnica de utilidad consolidada, la ddPCR se presenta como una alternativa muy prometedora especialmente para la monitorización de EMR en neoplasias con reordenamientos genómicos como la LMC o ciertos linfomas así como potencialmente para una aproximación basada en la biopsia líquida en tumores de presentación sólida (36).

CONCLUSIONES

- Las técnicas de estudio de aberraciones genómicas son un complemento esencial a las técnicas fenotípicas para la orientación diagnóstica, terapéutica y de monitorización de respuesta en pacientes con neoplasias hematológicas.
- Existen diversas técnicas siendo todas ellas complementarias. Aunque es posible que algunas de ellas vayan desapareciendo, en la actualidad, las distintas técnicas aportan información complementaria. Su aplicación depende del tipo de aberración y del momento del estudio pues todas ellas difieren en su resolución y en su sensibilidad.
- Pese a que la qRT-PCR continúa siendo una técnica de utilidad consolidada, la ddPCR se presenta como una alternativa muy prometedora especialmente para la monitorización de EMR en neoplasias con reordenamientos genómicos o mutaciones patogénicas. Esto es gracias a su gran precisión, sensibilidad, especificidad, reproducibilidad y rapidez, todas cualidades que hacen que sea una técnica coste eficiente.
- Gracias al gran conocimiento y estandarización internacional de la monitorización de la leucemia mieloide crónica, la introducción de la PCR digital para su monitorización, nos abre la puerta a la posibilidad de discontinuar el tratamiento con TKIs reduciendo el número de potenciales recaídas con respecto a la PCR cuantitativa estándar (reducción de recaídas del 50% al 30%), debido a una mejor linealidad en pacientes con baja carga tumoral.
- Este modelo de seguimiento nos sirve de ejemplo para ponerlo en práctica con otras neoplasias hematológicas líquidas, para así poder con ayuda de la PCR digital, conseguir una remisión completa de la misma tras dejar los tratamientos farmacológicos.
- Esta aplicación podría potencialmente extenderse a tumores de presentación sólida mediante la biopsia líquida, permitiendo identificar aberraciones subclonales accionables o predecesoras de recaídas o quizás en monitorizar la evolución frente a determinados fármacos. No obstante, se precisan más estudios para determinar la aplicabilidad de esta tecnología en este contexto.

BIBLIOGRAFÍA

1. J. Farfán B. BIOLOGÍA MOLECULAR APLICADA AL DIAGNÓSTICO CLÍNICO. Revista Médica Clínica Las Condes [Internet]. 2015 [cited 6 April 2020];26(6):788-793. Available from: <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-medica-clinica-las-condes-202-articulo-biologia-molecular-aplicada-al-diagnostico-S0716864015001546>
2. Zanolungo M S, Arrese J M, Rigotti R A. Medicina molecular: Presente y futuro. Revista médica de Chile [Internet]. 1999 [cited 6 April 2020];127(8). Available from: https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0034-98871999000800014&script=sci_arttext&lng=en
3. Di Sanzo M, Cipolloni L, Borro M, La Russa R, Santurro A, Scopetti M et al. Clinical Applications of Personalized Medicine: A New Paradigm and Challenge. Current Pharmaceutical Biotechnology [Internet]. 2017 [cited 6 April 2020];18(3):194-203. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28240172>
4. Gasperskaja E, Kučinskis V. The most common technologies and tools for functional genome analysis. Actamedica 2017;24. <https://doi.org/10.6001/actamedica.v24i1.3457>.
5. Germini D, Tsfasman T, Zakharova VV, Sjakste N, Lipinski M, Vassetzky Y. A Comparison of Techniques to Evaluate the Effectiveness of Genome Editing. Trends in Biotechnology 2018;36:147–59. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.10.008>.
6. Lay-Son RG, León PL. Perspectivas actuales sobre el diagnóstico genómico en pediatría. Revista Chilena de Pediatría 2015;86:3–11. <https://doi.org/10.1016/j.rchipe.2015.04.002>.
7. Pruebas moleculares y el tratamiento del cáncer. Leukemia and Lymphoma Society 2018. https://www.lls.org/sites/default/files/National/USA/Pdf/Publications/FS31S_Cancer_Molecular_Profiling_Spanish.pdf [internet] (accessed May 18, 2020).
8. Palacios-Verdú MG, Pérez-Jurado LA. Nuevas metodologías en el estudio de enfermedades genéticas y sus indicaciones 2014;XVIII:515–28. <https://www.pediatrintegral.es/wp-content/uploads/2014/xviii08/02/515-528.pdf>
9. Batlle-López A, Costa D, Martínez-Laperche C, Anguita E, Espinet B, Buño I. Genética Hematológica: Manual Práctico. Lapisoft Projects SL; 2016.
10. Valero-García J, González-Espinosa M, Barrios M, Carmona-Antoñanzas G, García-Planells J, Ruiz-Lafora C et al. Earlier relapse detection after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation by chimerism assays: Digital PCR versus quantitative real-time PCR of insertion/deletion polymorphisms. PLOS ONE [Internet]. 2019 [cited 6 April 2020];14(2):e0212708. Available from: https://genotipia.com/genetica_medica_news/pcr-digital-trasplante/
11. Hematologic Malignancy Profiling | Myeloid, lymphoma NGS panels [Internet]. Emea.illumina.com. 2020 [cited 6 April 2020]. Available from: <https://emea.illumina.com/areas-of-interest/cancer/clinical-cancer-research/somatic-mutations/hematological-cancers.html>
12. Walker-Daniels J. Current PCR Methods. MATER METHODS 2012;2. <https://doi.org/10.13070/mm.en.2.119>.

13. Cilloni D, Petiti J, Rosso V, Andreani G, Dragani M, Fava C et al. Digital PCR in Myeloid Malignancies: Ready to Replace Quantitative PCR?. International Journal of Molecular Sciences [Internet]. 2019 [cited 6 April 2020];20(9):2249. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6540058/>
14. Sciences L, (PCR) P, (qPCR) R, Center R, Basics R, PCR R. Real-Time vs Digital vs Traditional PCR | Thermo Fisher Scientific - UK [Internet]. Thermofisher.com. 2020 [cited 6 April 2020]. Available from: <https://www.thermofisher.com/es/es/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-vs-digital-vs-traditional-pcr.html>
15. Quan P, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: A Technology Review. Sensors [Internet]. 2018 [cited 6 April 2020];18(4):1271. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29677144/>
16. [Internet]. Campus.usal.es. 2020 [cited 26 May 2020]. Available from: http://campus.usal.es/~micromed/Practicas_odontologia/unidades/labv/imagenes_4/T%C3%89CNICAS%20GEN%C3%93MICAS.pdf
17. Biomedical and Biological Sciences. The principle of Real Time PCR, Reverse Transcription, quantitative rt-PCR. YouTube n.d. https://www.youtube.com/watch?v=DH7o9Df5_50 (accessed May 26, 2020).
18. TaqMan vs SYBR Chemistry - US n.d. <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/taqman-vs-sybr-chemistry-real-time-pcr.html> (accessed May 26, 2020).
19. TaqMan® vs. SYBR® Green Chemistries n.d. <https://www.biosyn.com/tew/taqman-vs-sybr-green-chemistries.aspx> (accessed May 26, 2020).
20. Digital PCR - US n.d. <https://www.thermofisher.com/us/en/home/life-science/pcr/digital-pcr.html> (accessed May 26, 2020).
21. QX200 Droplet Digital PCR System | Life Science Research | Bio-Rad n.d. <https://www.bio-rad.com/es-es/product/qx200-droplet-digital-pcr-system?ID=MPOQQE4VY> (accessed May 26, 2020).
22. Digital PCR and Liquid Biopsy | LSR | Bio-Rad [Internet]. Bio-rad.com. 2020 [cited 6 April 2020]. Available from: <https://www.bio-rad.com/es-es/applications-technologies/digital-pcr-liquid-biopsy?ID=NR4X8Z15>
23. Finotti A, Allegretti M, Gasparello J, Giacomini P, Spandidos D, Spoto G et al. Liquid biopsy and PCR-free ultrasensitive detection systems in oncology (Review). International Journal of Oncology [Internet]. 2018 [cited 6 April 2020];. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6086621/pdf/ijo-53-04-1395.pdf>
24. De Rubis G, Krishnan S, Bebawy M. Circulating tumor DNA – Current state of play and future perspectives. Pharmacological Research [Internet]. 2018 [cited 6 April 2020];136:35-44. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30142423>
25. Bellosillo B, Montagut C. High-accuracy liquid biopsies. Nat Med 2019;25:1820–1. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0690-1>.
26. Giraldez M, Chevillet J, Tewari M. Droplet Digital PCR for Absolute Quantification of Extracellular MicroRNAs in Plasma and Serum: Quantification of the Cancer Biomarker hsa-miR-141. Methods in Molecular Biology [Internet]. 2018 [cited 25

- April 2020];:459-474. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29717459>
27. Wood-Bouwens C, Ji H. Single Color Multiplexed ddPCR Copy Number Measurements and Single Nucleotide Variant Genotyping. *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2018 [cited 25 April 2020];:323-333. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29717451>
 28. Ferracin M, Negrini M. Quantification of Circulating MicroRNAs by Droplet Digital PCR. *Methods in Molecular Biology* [Internet]. 2018 [cited 25 April 2020];:445-457. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29717458>
 29. Gil BM, Valero D. NUEVAS TECNOLOGÍAS PARA EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO. *Rev Med Clin Condes* 2017;28:538–45. <https://doi.org/10.1016/j.rmcl.2017.06.002>.
 30. Kubackzova V, Vrabel D, Sedlarikova L, Besse L, Sevcikova S. Cell-free DNA - Minimally invasive marker of hematological malignancies. *Eur J Haematol* 2017;99:291–9. <https://doi.org/10.1111/ejh.12925>.
 31. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2014 update on diagnosis, monitoring, and management. *Am J Hematol* 2014;89:547–56. <https://doi.org/10.1002/ajh.23691>.
 32. Shan Y, DeSouza N, Qiu Q, Li S. Leukemia Stem Cells in Chronic Myeloid Leukemia. In: Zhang H, Li S, editors. *Leukemia Stem Cells in Hematologic Malignancies*, vol. 1143, Singapore: Springer Singapore; 2019, p. 191–215. https://doi.org/10.1007/978-981-13-7342-8_9.
 33. Alikian M, Gale RP, Apperley JF, Foroni L. Molecular techniques for the personalised management of patients with chronic myeloid leukaemia. *Biomolecular Detection and Quantification* 2017;11:4–20. <https://doi.org/10.1016/j.bdq.2017.01.001>.
 34. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood* 2013;122:872–84. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-05-501569>.
 35. Avelino KYPS, Silva RR, da Silva Junior AG, Oliveira MDL, Andrade CAS. Smart applications of bionanosensors for BCR/ABL fusion gene detection in leukemia. *Journal of King Saud University - Science* 2017;29:413–23. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.08.002>.
 36. Vinhas R, Cordeiro M, Pedrosa P, Fernandes AR, Baptista PV. Current trends in molecular diagnostics of chronic myeloid leukemia. *Leukemia & Lymphoma* 2017;58:1791–804. <https://doi.org/10.1080/10428194.2016.1265116>.
 37. Hochhaus A, Baccarani M, Silver RT, Schiffer C, Apperley JF, Cervantes F, et al. European LeukemiaNet 2020 recommendations for treating chronic myeloid leukemia. *Leukemia* 2020;34:966–84. <https://doi.org/10.1038/s41375-020-0776-2>.
 38. Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2018 update on diagnosis, therapy and monitoring. *Am J Hematol* 2018;93:442–59. <https://doi.org/10.1002/ajh.25011>.
 39. Berdeja JG, Heinrich MC, Dakhil SR, Goldberg SL, Wadleigh M, Kuriakose P, et al. Rates of deep molecular response by digital and conventional PCR with frontline nilotinib in newly diagnosed chronic myeloid leukemia: a landmark analysis. *Leukemia & Lymphoma* 2019;60:2384–93. <https://doi.org/10.1080/10428194.2019.1590569>.

40. Izzo B, Gottardi EM, Errichiello S, Daraio F, Baratè C, Galimberti S. Monitoring Chronic Myeloid Leukemia: How Molecular Tools May Drive Therapeutic Approaches. *Front Oncol* 2019;9:833. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00833>.
41. Haznedaroglu IC. MONITORING THE RESPONSE TO TYROSINE KINASE INHIBITOR (TKI) TREATMENT IN CHRONIC MYELOID LEUKEMIA (CML). *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2013;6:e2014009. <https://doi.org/10.4084/mjihid.2014.009>.
42. Alikian M, Whale AS, Akiki S, Piechocki K, Torrado C, Myint T, et al. RT-qPCR and RT-Digital PCR: A Comparison of Different Platforms for the Evaluation of Residual Disease in Chronic Myeloid Leukemia. *Clinical Chemistry* 2017;63:525–31. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.262824>.
43. Franke G-N, Maier J, Wildenberger K, Cross M, Giles FJ, Müller MC, et al. Comparison of Real-Time Quantitative PCR and Digital Droplet PCR for BCR-ABL1 Monitoring in Patients with Chronic Myeloid Leukemia. *The Journal of Molecular Diagnostics* 2020;22:81–9. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2019.08.007>.
44. Bernardi S, Malagola M, Zanaglio C, Polverelli N, Dereli Eke E, D’Adda M, et al. Digital PCR improves the quantitation of DMR and the selection of CML candidates to TKIs discontinuation. *Cancer Med* 2019;8:2041–55. <https://doi.org/10.1002/cam4.2087>.
45. Wang W-J, Zheng C-F, Liu Z, Tan Y-H, Chen X-H, Zhao B-L, et al. Droplet digital PCR for BCR/ABL(P210) detection of chronic myeloid leukemia: A high sensitive method of the minimal residual disease and disease progression. *Eur J Haematol* 2018;101:291–6. <https://doi.org/10.1111/ejh.13084>.
46. ¿Qué es el Linfoma No Hodgkin? [Internet]. Aecc.es. 2020 [cited 14 May 2020]. Available from: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/linfoma-no-hodgkin>
47. Jiang M, Bennani NN, Feldman AL. Lymphoma classification update: T-cell lymphomas, Hodgkin lymphomas, and histiocytic/dendritic cell neoplasms. *Expert Review of Hematology* 2017;10:239–49. <https://doi.org/10.1080/17474086.2017.1281122>.
48. Mugnaini EN, Ghosh N. Lymphoma. *Primary Care: Clinics in Office Practice* 2016;43:661–75. <https://doi.org/10.1016/j.pop.2016.07.012>.
49. Linfoma no Hodgkin - Subtipos de LNH [Internet]. Cancer.Net. 2020 [cited 14 May 2020]. Available from: <https://www.cancer.net/es/tipos-de-c%C3%A1ncer/linfoma-no-hodgkin/subtipos-de-lnh>
50. ¿Qué es?: Linfoma Hodgkin [Internet]. Aecc.es. 2020 [cited 14 May 2020]. Available from: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/linfoma-tipo-hodgkin>
51. Galimberti S, Genuardi E, Mazziotta F, Iovino L, Morabito F, Grassi S, et al. The Minimal Residual Disease in Non-Hodgkin’s Lymphomas: From the Laboratory to the Clinical Practice. *Front Oncol* 2019;9:528. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00528>.
52. Hiemcke-Jiwa LS, Minnema MC, Radersma-van Loon JH, Jiwa NM, de Boer M, Leguit RJ, et al. The use of droplet digital PCR in liquid biopsies: A highly sensitive technique for MYD88 p.(L265P) detection in cerebrospinal fluid. *Hematological Oncology* 2018;36:429–35. <https://doi.org/10.1002/hon.2489>.
53. Cavalli M, De Novi LA, Della Starza I, Cappelli LV, Nunes V, Pulsoni A, et al. Comparative analysis between RQ-PCR and digital droplet PCR of *BCL2/IGH* gene rearrangement in the peripheral blood and bone marrow of early stage follicular lymphoma. *Br J Haematol* 2017;177:588–96. <https://doi.org/10.1111/bjh.14616>.

54. Alcaide M, Yu S, Bushell K, Fornika D, Nielsen JS, Nelson BH, et al. Multiplex Droplet Digital PCR Quantification of Recurrent Somatic Mutations in Diffuse Large B-Cell and Follicular Lymphoma. *Clinical Chemistry* 2016;62:1238–47. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2016.255315>.
55. Camus V, Sarafan-Vasseur N, Bohers E, Dubois S, Mareschal S, Bertrand P, et al. Digital PCR for quantification of recurrent and potentially actionable somatic mutations in circulating free DNA from patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia & Lymphoma* 2016;57:2171–9. <https://doi.org/10.3109/10428194.2016.1139703>.